

HISTAMINA DETERMINADA POR FLUOROMETRIA, EN HARINA DE PESCADO Y LA MATERIA PRIMA SOMETIDA A DIFERENTES TEMPERATURAS.

HISTAMINE DETERMINED BY FLUOROMETRY, IN FISH MEAL AND THE RAW MATERIAL SUBJECTED TO DIFFERENT TEMPERATURES.

Christian Muñoz B. y Carlos Herrera C.***

RESUMEN

Se optimizó un método fluorométrico para determinar la concentración de histamina en harinas de pescado, el método incluye etapas de extracción en metanol, purificación con una resina de intercambio iónico, reacción de fluorescencia con o-ftaldialdehído y lectura en fluorómetro. Se observó un comportamiento lineal para concentraciones de histamina que oscilan entre 0,1 y 15 µg/5mL y una excelente selectividad de histamina frente a otras aminas biogénicas. Por otro lado, se evaluó las características de recuperación que presenta la resina, la que se cuantificó utilizando soluciones estándares de aminas biogénicas y muestras de harina de jurel *Trachurus symmetricus murphyi*, (Nichols, 1920) que fueron eluidas a través de la resina para su cuantificación en el fluorómetro. Se registraron recuperaciones de un 100% para concentraciones inferiores a 350 mg/Kg de histamina, y recuperaciones de 85 a 90% para concentraciones superiores. Posteriormente se analizaron muestras de harina de jurel y los resultados se compararon con los entregados por laboratorios de certificación externos a fin de evaluar la correlación entre los respectivos valores. Los resultados de correlación no mostraron diferencias significativas ($p=0,05$), sin embargo los valores obtenidos por el método fluorométrico fueron algo más bajos que los de HPLC, debido posiblemente a una retención de la histamina en la etapa de purificación por la resina. Finalmente el método fluorométrico fue aplicado al estudio del efecto de la temperatura de almacenamiento, sobre la materia prima antes de reducción a harina. Para ello se determinó la concentración de la amina biógena, a diferentes intervalos de tiempo en muestras de jurel, sometidas a diferentes temperaturas de refrigeración. Se observó que la producción de histamina bajó considerablemente en la medida que disminuía la temperatura, justificándose la conveniencia del almacenamiento refrigerado.

Palabras clave: Aminas biógenas, cuantificación, fluorometría, pescado, temperatura.

ABSTRACT

A fluorometric method was optimized in order to determine the concentration of histamine in fish meal, this method includes methanol extraction, ionic exchange purification and fluorescence reaction with o-phthalaldehyde. A lineal behaviour was found for histamine concentrations ranging from 0.1 to 15 µg/5mL and an excellent selectivity for histamine in the presence of other biogenic amines. On the other hand the recovery, from the ion exchange resin, was evaluated, through the employment of standard solutions of biogenic amines and mackerel *Trachurus symmetricus murphyi*, (Nichols, 1920) meal samples, quantified in the fluorometer after been eluted from the resin. Recoveries of the order of 100% were obtained for concentrations solutions of histamine lower than 350 mg/Kg, and from 85 to 90% recovery for

Fecha de recepción: 13-11-00. Fecha de aceptación: 10-06-01.

*Laboratorio, Planta de Harina, Pesquera El Golfo, Av. Colón 2400, Talcahuano, Chile.

**Facultad de Ciencias, Universidad Católica de la Santísima Concepción, Casilla 297, Concepción, Chile.

E-mail: cherrera@ucsc.cl

higher concentrations solutions. Then samples of fish meal were analyzed, for histamine concentration and the results compared to those found by certification laboratories, in order to evaluate the correlation found between the respective values. The correlation results showed no significant differences ($p=0.05$), but nevertheless, the values found by the fluorometric method, were slightly lower than those of HPLC, this could be due to retention of histamine by the resin in the purification step. The fluorometric method was finally applied to the study of the effect of storage temperature, on the raw material, previous to meal reduction, measured by the determination of the biogenic amine, several times for a period of 3 days in mackerel, kept at different temperatures. The lowest the temperature, the lower the values of histamine concentration was found, thus refrigeration of raw material is highly convenient.

Key words: Biogenic amines, quantification, fluorometry, fish, temperature.

INTRODUCCION

En Chile se ha estado produciendo un gran volumen de harina de pescado, por lo que ha sido considerado como uno de los primeros productores a nivel mundial, (SERNAP, 1994).

En la VIII región, que es donde se han producido los más altos porcentajes de harina de pescado, el jurel es la principal materia prima. Este es capturado por el sistema de cerco, cuyos cardúmenes comerciales alcanzan hasta más de 40 metros de profundidad encontrándose alejados de la costa, (Vergara, 1984).

Debido al traslado, se producen prolongados intervalos de tiempo desde la captura hasta el inicio del proceso, el pescado se ve afectado durante este período, en sus componentes más esenciales tales como la fracción proteica y los lípidos, por la actividad enzimática debida a la contaminación bacteriana (Arnold & Brown, 1978).

Se ha comprobado que un buen indicador de la degradación de la materia prima corresponde a la amina biógena tóxica histamina. Por ello las harinas que contienen niveles significativos de esta amina, se ven disminuidas en su valor comercial, con el eminente peligro para el consumo como alimento (Rodríguez-Jerez *et al.*, 1994).

A consecuencia de lo señalado, las plantas reductoras se han visto en la necesidad de disponer de métodos capaces de detectar y cuantificar la concentración de histamina, con el propósito de verificar si el producto cumple con las exigencias requeridas para su comercialización.

Se han conocido muchas y muy diversas técnicas para cuantificar la concentración de histamina entre las que se destacan: bioensayos, métodos cromatográficos, fluorométricos, electroforéticos y enzimáticos (López-Sabater *et al.*, 1993).

El objetivo de este trabajo es optimizar y comparar el método fluorométrico, que incluye una separación previa por resina de intercambio iónico, oficializado por la A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemists) para la cuantificación de histamina en harinas de pescado.

Los objetivos específicos comprenden el estudio de: el comportamiento del fluorómetro, la selectividad y recuperación de la amina biógena por la resina, la comparación de los valores de histamina en harina según el método fluorométrico, con los de HPLC de dos laboratorios externos y la evaluación del efecto, que tiene la refrigeración de la materia prima en los pozos, previo a su reducción, sobre la producción de histamina.

La espectroscopía de fluorescencia, que utiliza instrumentos que funcionan a base de fenómenos fotoquímicos (Saavedra, 1984), ha tomado un papel más importante en el análisis rutinario, particularmente en la determinación de contaminantes a niveles traza en el medio ambiente, las industrias y el cuerpo humano, debido a que los compuestos analizados por fluorescencia pueden ser determinados con mucho mayor sensibilidad, en valores tan bajos como $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y también con mayor especificidad. El método para la histamina fue desarrollado por Staruszkiewics *et al.*, (1977) el que se basa en el acoplamiento de la histamina con el o-ftaldialdehído (OPT) a pH fuertemente alcalino para formar un producto fluorescente. Su alta sensibilidad radica en la diferencia existente entre las longitudes de onda de radiación de excitación y la fluorescente. Su alta especificidad proviene de que depende de dos espectros, los espectros de excitación y de emisión. Una gráfica que muestra las unidades de fluorescencia v/s concentración de estándares da lugar a la curva de calibración (Skoog & Leary, 1994).

MATERIALES Y METODOS

El estudio se realizó durante el periodo comprendido entre los meses de agosto y noviembre de 1995 en el laboratorio de control de calidad de la empresa Pesquera El Golfo S.A.

Se trabajó con muestras de harina de jurel (*Trachurus symmetricus murphyi*, Nichols, 1920), y muestras de la materia prima, obtenidas de la producción diaria de la empresa mencionada anteriormente.

Se trabajó con una técnica usada en Fundación Chile, método oficial de la A.O.A.C., basada en la extracción de la histamina con metanol, purificación a través de una resina de intercambio aniónico fuertemente alcalina y reacción de condensación con OPT, para leer finalmente en el fluorómetro.

Los estándares de aminas biogénicas en forma de clorhidrato, la resina de intercambio aniónico (Tipo III), el cromóforo OPT y otros reactivos de uso común, de grado p. a., fueron obtenidos de la firma Merck, el Fluorómetro de filtro utilizado fue de marca Turner Designs modelo 10-AU de lectura digital directa, además se emplearon un baño termostataado GFL Tipo 1042 y una centrífuga IEC HN-SII.

El estudio se realizó por etapas, de la siguiente forma :

Curva de calibración de histamina

Para evaluar la linealidad se prepararon estándares de histamina cuyos rangos variaron entre 0,1 y 4 ppm, a partir de diclorhidrato de histamina. Se leyó la fluorescencia en una celda de cuarzo a una longitud de onda de 335 nm de excitación y 420 nm de emisión en el fluorómetro.

Con los datos obtenidos se construyó una curva de unidades de fluorescencia versus concentración de histamina. La concentración de histamina en las muestras se obtuvo por interpolación de la curva de calibración.

Selectividad

Para evaluar la selectividad, se preparó una solución stock de 2000 ppm constituidos por una mezcla de aminas biogénicas, de composición: Putrescina 9%, Cadaverina 22%, Histamina 60%, Tiramina 5% y Feniletilamina 5%

Recuperación en la separación de la resina

Se usó una resina de intercambio aniónico fuertemente alcalina, contenida dentro de una columna de 1,3 cm de diámetro interior y 10 cm

de altura. En primer lugar se prepararon estándares de histamina de concentración entre 0 y 500 ppm y luego otro grupo de 1000 a 5000 ppm. Una alícuota de 1,0 mL de cada uno se hizo pasar por la resina, desde donde se eluyó con agua destilada, recibiendo la muestra en un matraz aforado de 50 mL hasta completar volumen, a una velocidad que no excediera los 2 mL/min. y luego se cuantificó su concentración en el fluorómetro.

Comparación con laboratorios externos

Finalmente se determinó la concentración de histamina en muestras de harina de jurel por el método fluorométrico, para correlacionarlos con los datos obtenidos paralelamente por un método cromatográfico (HPLC) de laboratorios de certificación externos, basado en la extracción con ácido tricloroacético y derivatización con cloruro de dansilo.

Efecto de la temperatura sobre el almacenamiento de la materia prima

Una vez optimizado el método fluorimétrico, se aplicó al estudio de la conveniencia de refrigerar la materia prima almacenada en los pozos (lugar de recepción de la materia prima antes de procesarla). Para ello se trabajó con 90 ejemplares separados en tres grupos de igual número sometidos a diferentes temperaturas.

El primer grupo se mantuvo a 3°C y el segundo grupo a 8°C, durante 3 días y a intervalos de 8 horas se tomaron muestras para determinar la concentración de histamina. El tercer grupo se mantuvo a temperatura ambiente (estimada en 22° C por corresponder al mes de Diciembre) bajo condiciones similares a las de recepción de la materia prima, se utilizó como grupo control de la experiencia, determinando con la misma metodología que a los otros grupos, su concentración en histamina.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Fig. 1 se puede observar la curva de calibración construida según los datos obtenidos por la técnica fluorométrica, se aprecia una excelente linealidad de respuesta $R = 0,9998$ para concentraciones que varían entre 0,5 y 15 $\mu\text{g}/5\text{ml}$; sin embargo, a concentraciones mayores se aprecian desviaciones que posiblemente sean debidas a la capacidad de resolu-

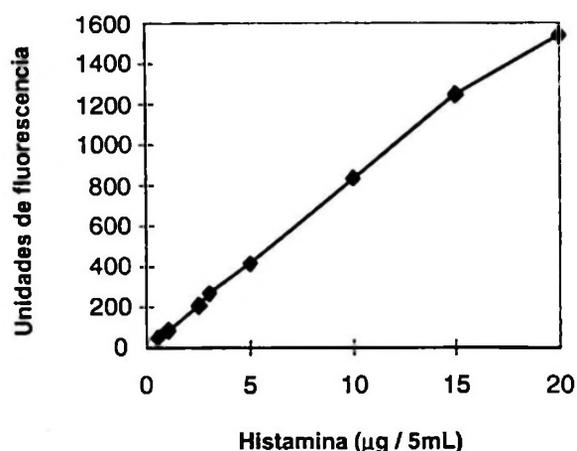


Fig. 1: Curva de calibración para la determinación de histamina por fluorometría.

Standard curve for histamine determination by fluorometry.

ción que presenta el fluorómetro, la que se ve afectada por fenómenos ópticos (intensidad de la radiación, respuesta de la lámpara de mercurio, etc.). En base a estos antecedentes se puede deducir que el rango óptimo de trabajo se sitúa entre 0,1 y 15 µg/5mL y si de una muestra a analizar se obtiene valores mayores, será necesario hacer diluciones.

Con respecto al comportamiento del fluorómetro frente al conjunto de aminas biógenas, se encontró que la respuesta entregada por el fluorómetro para las soluciones de es-

Tabla 1. Recuperación de la resina de intercambio iónico Soluciones estándares de histamina (0 a 500 ppm).

Recovery from the ionic exchange resin Histamine standard solutions (0 to 500 ppm).

Conc. Estándares histamina	Conc. Estándares de histamina eluidos	% recuperación
0	0	0
50	50	100
100	98	98
150	148	98,7
200	190	95
250	240	96
300	280	93
350	330	91,4
400	360	90
450	411	93
500	460	92

tándares, corresponde al porcentaje de histamina presente en cada una de las soluciones. Con ésto se puede inferir que el fluorómetro es altamente selectivo por la histamina frente a las otras aminas biógenas, lo que se puede explicar debido a que el OPT es altamente específico para la histamina, en comparación con las otras aminas a las condiciones básicas de pH y además por el sistema de filtros de interferencia que posee el equipo, los que seleccionan determinadas longitudes de ondas (excitación 335nm y emisión de 420nm) específicas para la histamina.

Al analizar las Tablas 1 y 2, donde se resumen los datos correspondientes a las propiedades de recuperación que presenta la resina, se observan recuperaciones entre 90 y 100% para concentraciones inferiores a 350 ppm de histamina y de un 85-90% para concentraciones superiores. Esta baja de rendimiento a las concentraciones más altas, puede explicarse por el aumento en la cantidad de histamina por unidad de volumen, donde se produce una saturación del intercambiador iónico, quedando retenida parte de la histamina en los poros de la resina modificándose los resultados obtenidos. Probablemente esta sea una de las causas que expliquen los resultados más bajos que se obtienen, en comparación con los entregados por laboratorios de certificación externos, cuyos resultados más altos que los entregados por el método en estudio, podrían explicarse además por diferencias en el tratamiento químico previo al análisis de las muestras, lo que conduce a diferencias en los resultados, por ejemplo los rendimientos de reacción de los dansil derivados es mayor que en

Tabla 2. Recuperación desde la resina de intercambio iónico Soluciones estándares de histamina (1000 a 5000 ppm).

Recovery from the ionic exchange resin Histamine standard solutions (1000 to 5000 ppm).

Conc. Estándares histamina	Conc. Estándares de histamina eluidos	% recuperación
1000	845	84,5
2000	1719	86
3000	2519	83,9
4000	3633	90,1
5000	4537	90,6

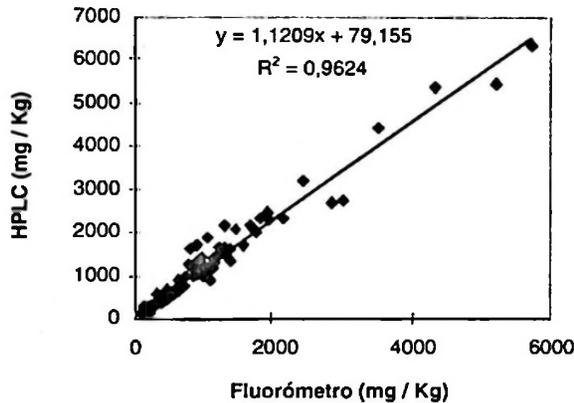


Fig. 2: Correlación entre valores de concentración de histamina en harinas de pescado determinados por fluorometría y HPLC.

Correlation between histamine concentration values in fish meal determined by fluometry and HPLC.

los OPT derivados (Gray, 1972), también influyen las diferencias en polaridad de los respectivos solventes empleados (Taylor et al., 1978). Por otra parte, las columnas usadas en HPLC tienen un rendimiento mayor que las rellenas con resinas de intercambio iónico, por trabajar a presiones muy altas.

Sin embargo, en la Fig. 2 donde se puede observar la correlación existente entre los valores presentados por el método estudiado y uno de los laboratorios de certificación externos, en la curva representativa del laboratorio N° 1, la distribución de los datos del método fluorimétrico y los del método HPLC de los laboratorios externos son muy simétricos, hasta una concentración aproximadamente de 1000 ppm. A concentraciones superiores se produce una dispersión mayor de los datos, aunque se tiene un alto coeficiente de correlación ($R^2=0,96348$) y el valor experimental calculado para χ^2 según la prueba de Friedman (Miller & Miller, 1993), resultó bastante menor ($\chi^2 = 19,62$) que el valor crítico según tabla ($\chi^2 = 42,69$, g.l = 29), lo que demuestra que no existen diferencias significativas ($p=0,05$) entre dichas metodologías.

En resumen, en base a los resultados obtenidos y los antecedentes discutidos en este estudio, se deduce que el método fluorométrico estudiado, es una alternativa confiable para determinar histamina en harinas de pescado, ya que se encontró altamente selectivo por la histamina, presentando además, un amplio rango de trabajo, con un gran poder de resolución, su

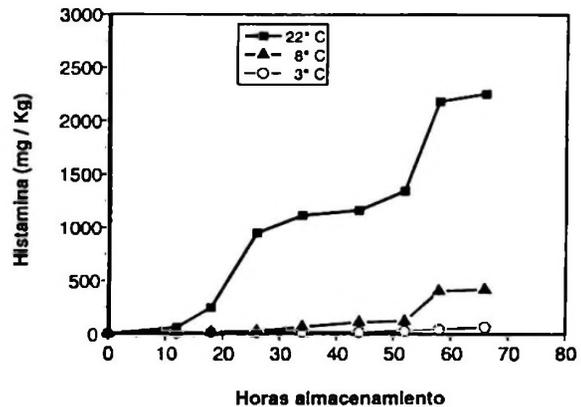


Fig. 3: Producción de histamina por la materia prima sometida a diferentes temperaturas.

Histamine produced by the row material subjected to different temperatures.

alta sensibilidad permite determinar histamina a valores de concentración muy pequeños (en el orden de ppb), y es de bajo costo en comparación con otros métodos más sofisticados.

Finalmente en lo que respecta al estudio del efecto de la temperatura, en la Fig. 3 se muestran los resultados comparativos para las tres temperaturas, se aprecia claramente que a 3°C, la producción de histamina en el tiempo es muy escasa, a 8°C si bien se tienen valores mayores de concentración de la amina que los de 3°C, se nota una franca disminución respecto a lo que se encuentra a temperatura ambiente, condición que normalmente se emplea en las pesqueras. Esta última serie de datos, muestra además las variaciones típicas que son de esperar, al variar la temperatura entre las diferentes horas del día, presentando una curva con varias inflexiones. Se puede concluir que es muy conveniente refrigerar la materia prima y que mientras más baja sea la temperatura de almacenamiento, se conservará mayor tiempo la materia prima en buen estado, lo que traerá como consecuencia la producción de una harina de mejor calidad, puesto que disminuye considerablemente la velocidad de las reacciones de descomposición, debidas a las enzimas que se producen por el crecimiento bacteriano. Si bien la temperatura de 3°C puede ser considerada como la de elección en este caso, la refrigeración a 8°C muestra resultados aceptables, que pueden ser convenientes de usar, cuando la economía en energía de refrigeración es importante para las empresas pesqueras.

AGRADECIMIENTOS

El primer autor desea agradecer las facilidades otorgadas para desarrollar este estudio, como tema de su práctica profesional, por la Empresa Pesquera El Golfo y en forma muy especial al personal del laboratorio de Control de calidad de la "Planta de harina".

LITERATURA CITADA

- ANUARIO SERNAP, 1994. Depto. Sistemas de información y estadísticas pesqueras del Servicio Nacional de Pesca de Chile, Ministerio de Economía Fomento y Reconstrucción. pp 236.
- ARNOLD, S. H. & W. D. BROWN, 1978. Histamine (?) toxicity from fish products. *Advances in Food Research*, 24: 113-154.
- GRAY, W.R. 1972. End group analysis using dansyl chloride. *Methods in Enzymology*, 25: 121-139.
- LOPEZ-SABATER, E. I., J. J. RODRIGUEZ-JEREZ, A. X. ROIG-SAGUES & M. T. MORA-VENTURA 1993. Determination of histamine in fish using an enzymic method. *Food additives and contaminants*, 10: 593-602.
- MILLER, J. C. & J. N. MILLER, 1993. *Estadística para Química Analítica*. 2da edición, Addison-Wesley Iberoamericana, Wilmington, Delaware, E. U. A. pp 211.
- RODRIGUEZ-JEREZ, J. J., M. T. MORA-VENTURA & T. CIVERA 1994. Istamina e prodotti ittici: un problema attuale. *Industrie Alimentari*, 33: 299-307.
- SAAVEDRA, M. 1984 Estudios por fluorescencia de cambios conformacionales en la alfa-quimiotripsina inducidos por disolventes usados en la síntesis de péptidos. Tesis para optar al título de Licenciatura en Química, Pontificia U. Católica de Chile. pp 73.
- SKOOG, D. A. & J. J. Leary, 1994. *Análisis instrumental*. 4ta edición, Mc Graw-Hill, Madrid, España. pp 935.
- STARUSZKIEWICS, W. F., E. M. WALDRON & J. F. BOND 1977. Fluorometric determination of histamine in tuna: development of method. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 60: 1125-1130.
- TAYLOR, S., E. LIEBER & M. LEATHERWOOD 1978. A simplified method for histamine analysis of foods. *Journal of Food Science*, 43: 247-250.
- VERGARA, R. 1984. Antecedentes de embarque y exportaciones de harina de pescado. Tesis para optar al título de Técnico Marino, Pontificia U. Católica de Chile, Sede Regional Talcahuano, pp 51.